

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **015779**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2011.12.30

(21) Номер заявки
200970486

(22) Дата подачи заявки
2007.11.14

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ МИТОЗОА(31) **60/859,340**(32) **2006.11.16**(33) **US**(43) **2009.10.30**(86) **PCT/US2007/023948**(87) **WO 2008/063525 2008.05.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МИЛЛЕННИУМ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

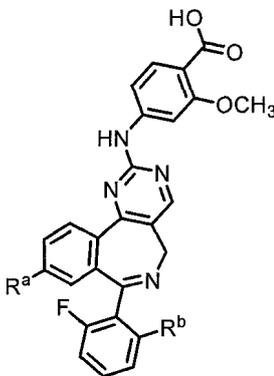
(72) Изобретатель:
**Клэйборн Кристофер Ф., Селлс Тодд
Б., Страуд Стефен Г. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A-2005/111039
WO-A-98/28281**

WENLE XIA ET AL.: "Tumor selective G2/M cell cycle arrest and apoptosis of epithelial and hematological malignancies by BBL22, a benzazepine" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 13, 2000, pages 7494-7499, XP002354250 ISSN: 0027-8424 page 7495, left-hand column, paragraph 1; table 2; compound BBL22

(57) Изобретение относится к соединениям формулы (I) и к способам лечения рака. В частности, настоящее изобретение предусматривает активные ингибиторы Аугога А киназы, фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, и способы применения соединений для лечения рака.



(I)

015779 B1**015779 B1**

Уровень техники

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании временной заявки на патент США № 60/859340, поданной 16 ноября 2006 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки полным объемом.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к соединениям и способам лечения рака. В частности, настоящее изобретение обеспечивает соединение, которое ингибирует ферменты Аугога-киназы, фармацевтические композиции, содержащие соединение, и способы применения соединения для лечения рака.

Уровень техники

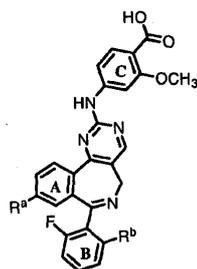
Согласно Американскому Раковому Обществу, считается, что 1,4 миллиона американцев имели диагноз вновь выявленный рак в 2004 году и примерно 560000 жертв умерли от этого заболевания. Хотя развитие медицины повысило процент выживаемости при раке, все еще имеется потребность в новом и более эффективном лечении.

Рак характеризуется неконтролируемым размножением клеток. Митоз представляет собой стадию в клеточном цикле, в течение которой ряд сложных событий обеспечивает правильность разделения хромосом для двух дочерних клеток. Несколько современных видов противораковой терапии, включая таксаны и алкалоиды винка, действуют, ингибируя митотические механизмы. Последовательность стадий митоза регулируется по большей части посредством протеолиза и событий фосфорилирования, которые опосредованы митотическими киназами. Члены семейства Аугога-киназ (например, Aurora A, Aurora B, Aurora C) регулируют последовательность стадий митоза посредством модулирования разделения центросомы, динамики митотического веретена, реперной точки сборки митотического веретена, совмещения хромосом и цитокинеза (Dutertre et al., *Oncogene*, 21: 6175 (2002); Berdnik et al., *Curr. Biol.*, 12: 640 (2002)). Сверхэкспрессия и/или амплификация Аугога-киназ связаны с онкогенезом у нескольких типов опухолей, включая опухоли толстой кишки и груди (Warner et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2: 589 (2003); Bischoff et al., *EMBO*, 17: 3062 (1998); Sen et al., *Cancer Res.*, 94: 1320 (2002)). Кроме того, ингибирование Аугога-киназы в клетках опухоли приводит к приостановке митоза и к апоптозу, что говорит о том, что эти киназы являются важными мишенями для противораковой терапии (Ditchfield, *J. Cell Biol.*, 161:267 (2003); Harrington et al., *Nature Med.*, 1 (2004)). Исходя из центральной роли митоза в развитии по существу всех злокачественных образований, ингибиторы Аугога-киназ, как ожидается, найдут применение для большего набора опухолей человека. Таким образом, имеется необходимость в новых ингибиторах Аугога-киназы.

Описание изобретения

Claiborne et al., публикация заявки на международный патент WO 05/111039, описывает пиримидо-бензазепиновые соединения, обладающие ингибирующей активностью по отношению к Аугога-киназе. Авторы настоящего изобретения обнаружили пиримидобензазепиновые соединения с неожиданно высокой активностью против Аугога А киназы. Предложенные соединения являются полезными для ингибирования активности Аугога А киназы *in vitro* и *in vivo* и являются особенно полезными при лечении различных заболеваний, связанных с пролиферацией клеток.

В одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное формулой (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^a выбирают из группы, состоящей из C_{1-3} алифатической группы, C_{1-3} фторалифатической группы, $-R^1$, $-T-R^1$, $-R^2$ и $-T-R^2$;

T представляет собой C_{1-3} алкиленовую цепь, необязательно замещенную фтором;

R^1 представляет собой необязательно замещенную арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу;

R^2 выбирают из группы, состоящей из галогена, $-C\equiv C-R^3$, $-CH=CH-R^3$, $-N(R^4)_2$ и $-OR^5$;

R^3 представляет собой атом водорода или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу;

каждый R^4 независимо представляет собой атом водорода или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу; или два R^4 у одного и того же атома азота, взятые вместе с атомом азота, образуют необязательно замещенное 5-6-членное гетероарильное

или 4-8-членное гетероциклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому азота, 0-2 кольцевых гетероатома, выбранных N, O и S;

R^5 представляет собой атом водорода или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу; и

R^b выбирают из группы, состоящей из фтора, хлора, $-CH_3$, $-CF_3$, $-OH$, $-OCH_3$, $-OCF_3$, $-OCH_2CH_3$ и $-OCH_2CF_3$.

В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой 5- или 6-членное арильное, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, необязательно замещенное одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-3} алифатической группы и C_{1-3} фторалифатической группы. В определенных вариантах осуществления R^1 представляет собой фенильное, фурильное, пирролидинильное или тиенильное кольцо, необязательно замещенное одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-3} алифатической группы и C_{1-3} фторалифатической группы.

В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой атом водорода, C_{1-3} алифатическую группу, C_{1-3} фторалифатическую группу или $-CH_2-OCH_3$.

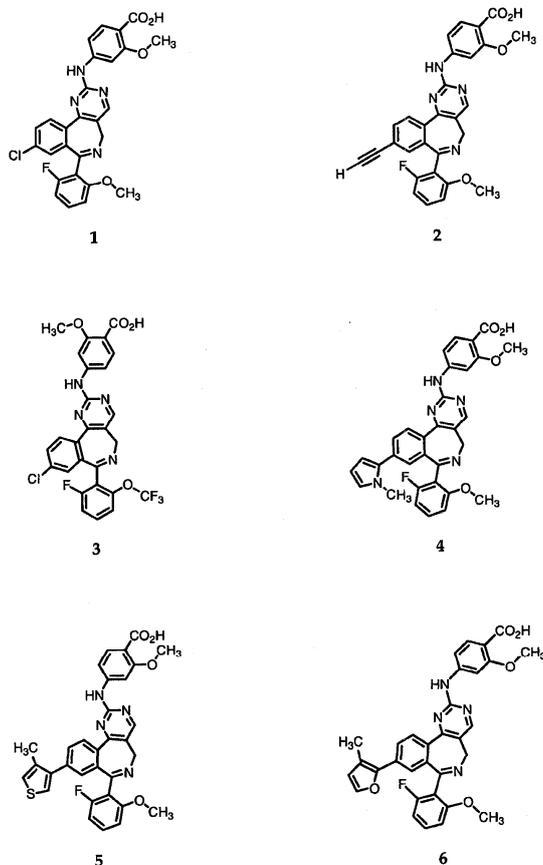
В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой атом водорода, C_{1-3} алифатическую группу или C_{1-3} фторалифатическую группу.

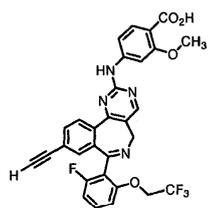
В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой галоген, C_{1-3} алифатическую группу, C_{1-3} фторалифатическую группу, $-OH$, $-O(C_{1-3}$ алифатическую группу), $-O(C_{1-3}$ фторалифатическую группу), $-C\equiv C-R^3$, $-CH=CH-R^3$ или необязательно замещенное пирролидинильное, тиенильное, фурильное или фенильное кольцо, где R^3 представляет собой атом водорода, C_{1-3} алифатическую группу, C_{1-3} фторалифатическую группу или $-CH_2-OCH_3$. В определенных конкретных вариантах осуществления R^a выбирается из группы, состоящей из хлора, фтора, C_{1-3} алифатической группы, C_{1-3} фторалифатической группы, $-OCH_3$, OCF_3 , $-C\equiv C-H$, $-C\equiv C-CH_3$, $-C\equiv C-CH_2OCH_3$, $-CH=CH_2$, $-CH=CHCH_3$, N-метилпирролидинила, тиенила, метилтиенила, фурила, метилфурила, фенила, фторфенила и толила.

Таблица 1 показывает конкретные примеры соединений формулы (I).

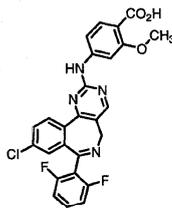
Таблица 1

Ингибиторы Aurora-киназы

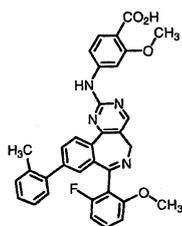




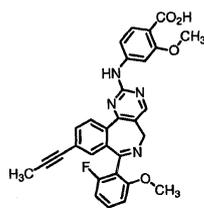
7



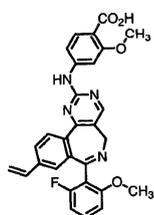
8



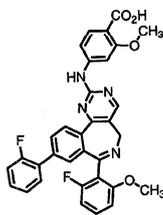
9



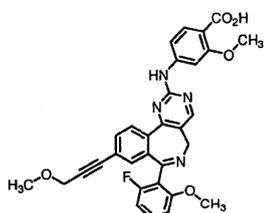
10



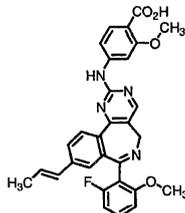
11



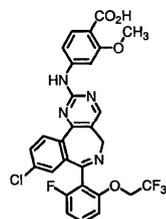
12



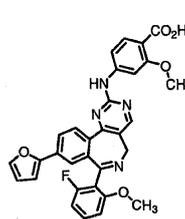
13



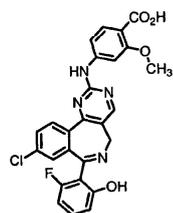
14



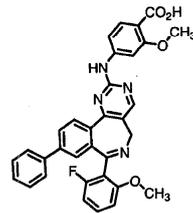
15



16



17



18

Соединения в табл. 1 выше также могут идентифицироваться с помощью следующих химических наименований:

	Химическое наименование
1	4-([9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
2	4-([9-этинил-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
3	4-({9-хлор-7-[2-фтор-6-(трифторметокси)фенил]-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
4	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(1-метил-1Н-пиррол-2-ил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
5	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(4-метил-3-тиенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
6	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(3-метил-2-фурил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
7	4-({9-этинил-7-[2-фтор-6-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
8	4-([9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
9	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(2-метилфенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
10	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-проп-1-ин-1-ил-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
11	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-винил-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота
12	4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(2-фторфенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил)амино)-2-метоксибезойная кислота

13	4-({7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(3-метоксипроп-1-ин-1-ил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота
14	4-({7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-[(1E)-проп-1-ен-1-ил]-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота
15	4-({9-хлор-7-[2-фтор-6-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота
16	4-({7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(2-фурил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота
17	4-({9-хлор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота
18	4-({7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-фенил-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибезойная кислота

В одном из вариантов осуществления соединение формулы (I) представляет собой 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибезойную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль. В конкретном варианте осуществления соединение формулы (I) представляет собой натрий 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино)-2-метоксибензоат.

Если не указано иного, структуры, изображенные здесь, как подразумевается, включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие представленную выше структуру, за исключением замены атома водорода дейтерием или тритием или замены атома углерода ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, находятся в рамках настоящего изобретения.

Термин "алифатический" или "алифатическая группа", как здесь используется, обозначает замещенный или незамещенный, имеющий прямую или разветвленную цепь или циклический C_{1-12} углеводород, который является полностью насыщенным или который содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но который не является ароматическим. Например, соответствующие алифатические группы включают замещенные или незамещенные линейные, разветвленные или циклические алкильные, алкенильные, алкинильные группы и их гибриды, такие как (циклоалкил)алкил, (циклоалкенил)алкил или (циклоалкил)алкенил.

Термин "циклоалифатический", используемый отдельно или как часть большего остатка, относится к насыщенной или частично ненасыщенной циклической алифатической кольцевой системе, имеющей от 3 до примерно 14 элементов, где алифатическая кольцевая система является необязательно замещенной. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа представляет собой моноциклический углеводород, имеющий 3-8 или 3-6 кольцевых атомов углерода. Неограничивающие примеры включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклогептенил, циклооктил, циклооктенил и циклооктадиенил. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа представляет собой соединенный мостиком или конденсированный бициклический углеводород, имеющий 6-12, 6-10 или 6-8 кольцевых атомов углерода, где любое индивидуальное кольцо в бициклической кольцевой системе имеет 3-8 элементов.

В некоторых вариантах осуществления два соседних заместителя на циклоалифатическом кольце, взятые вместе с общими кольцевыми атомами, образуют необязательно замещенное конденсированное 5-6-членное ароматическое или 3-8-членное неароматическое кольцо, имеющее 0-3 кольцевых гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Таким образом, термин "циклоалифатический" включает алифатические кольца, которые являются конденсированными с одним или несколькими арильными, гетероарильными или гетероциклическими кольцами. Неограничивающие примеры включают инданил, 5,6,7,8-тетрагидрохиноксалинил, декагидронафтил или тетрагидронафтил, где радикал или точка присоединения находится на алифатическом кольце. Термин "циклоалифатический" может использоваться взаимозаменяемо с терминами "карбоцикл", "карбоциклил", "карбоцикло" или "карбо-

циклический".

Термины "арил" и "ар-", используемые отдельно или как часть большего остатка, например "аралкил", "аралкокси" или "арилоксиалкил", относятся к C_6 - C_{14} ароматическому углеводороду, содержащему одно-три кольца, каждое из которых является необязательно замещенным. Предпочтительно, арильная группа представляет собой C_6 - C_{10} арильную группу. Арильные группы включают, без ограничения, фенил, нафтил и антраценил. В некоторых вариантах осуществления два соседних заместителя на арильном кольце, взятые вместе с общими кольцевыми атомами, образуют необязательно замещенное конденсированное 5-6-членное ароматическое или 4-8-членное неароматическое кольцо, имеющее 0-3 кольцевых гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Таким образом, термин "арил", как здесь используется, включает группы, в которых ароматическое кольцо является конденсированным с одним или несколькими гетероарильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами, где радикал или точка присоединения находится на ароматическом кольце. Неограничивающие примеры таких конденсированных кольцевых систем включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазол, бензимидазол, бензтиазол, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил, хинолинил, хиноксалинил, карбазол, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, флуоренил, инданил, фенантридинил, тетрагидронафтил, индолинил, феноксазинил, бензодиоксанил и бензодиоксолил. Арильная группа может быть моно-, би-, три- или полициклической, предпочтительно, моно-, би- или трициклической, более предпочтительно, моно- или бициклической. Термин "арил" может использоваться взаимозаменяемо с терминами "арильная группа", "арильный остаток" и "арильное кольцо".

"Аралкил" или "арилалкильная" группа включает арильную группу, ковалентно соединенную с алкильной группой, каждая из них независимо является необязательно замещенной.

Предпочтительно, аралкильная группа представляет собой C_{6-10} арил (C_{1-6}) алкил, C_{6-10} арил (C_{1-4}) алкил или C_{6-10} арил (C_{1-3}) алкил, включая, без ограничения, бензил, фенэтил и нафтилметил.

Термины "гетероарил" и "гетероар-", используемые отдельно или как часть большего остатка, например, гетероаралкил или "гетероаралкокси", относятся к группам, имеющим 5-14 кольцевых атомов, предпочтительно 5, 6, 9 или 10 кольцевых атомов, имеющим 6, 10 или 14 π электронов, обобществленных в циклическом ряду; и имеющим в дополнение к атомам углерода от одного до четырех гетероатомов. Термин "гетероатом" относится к атому азота, кислорода или серы и включает любую окисленную форму азота или серы и любую кватернизированную форму основного азота. Гетероарильные группы включают, без ограничения, тиенил, фуранил, пирролил, имидазол, пиразол, триазол, тетразол, оксазол, изоксазол, оксадиазол, тиазол, изотиазол, тиадиазол, пиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, индолизинил, пуридил, нафтиридинил и птеридинил. В некоторых вариантах осуществления два соседних заместителя на гетероариле, взятые вместе с общими кольцевыми атомами, образуют необязательно замещенное конденсированное 5-6-членное ароматическое или 4-8-членное неароматическое кольцо, имеющее 0-3 кольцевых гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Таким образом, термины "гетероарил" и "гетероар-", как здесь используется, также включают группы, в которых гетероароматическое кольцо является конденсированным с одним или несколькими арильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами, где радикал или точка присоединения находится на гетероароматическом кольце. Неограничивающие примеры включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазол, бензимидазол, бензтиазол, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил, хинолинил, хиноксалинил, 4Н-хинолизинил, карбазол, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил и пиридо[2,3-*b*]-1,4-оксазин-3(4Н)-он. Гетероарильная группа может быть моно-, би-, три- или полициклической, предпочтительно, моно-, би- или трициклической, более предпочтительно, моно- или бициклической. Термин "гетероарил" может использоваться взаимозаменяемо с терминами "гетероарильное кольцо", "гетероарильная группа" или "гетероароматическая группа", любой из этих терминов включает кольца, которые являются необязательно замещенными. Термин "гетероаралкил" относится к алкильной группе, замещенной гетероарилом, где алкильная и гетероарильная части независимо являются необязательно замещенными.

Как здесь используется, термины "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклический радикал" и "гетероциклическое кольцо" используются взаимозаменяемо и относятся к стабильному 3-7-членному моноциклическому или к конденсированному 7-10-членному, или к соединенному мостиком 6-10-членному бициклическому гетероциклическому остатку, который является либо насыщенным, либо частично ненасыщенным и имеет, в дополнение к атомам углерода, один или несколько, предпочтительно, один-четыре гетероатома, как определено выше. Когда он используется по отношению к кольцевому атому гетероцикла, термин "азот" включает замещенный азот. Как пример, в гетероциклическом кольце, имеющем 1-3 гетероатома, выбранных из атомов кислорода, серы или азота, азот может представлять собой N (как в 3,4-дигидро-2Н-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или ^+NR (как в N-замещенном пирролидиниле). Гетероциклическое кольцо может соединяться с боковой группой на любом гетероатоме или атоме углерода, если это приводит к получению стабильной структуры, и любой из кольцевых атомов может быть необязательно замещенным. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщен-

ных гетероциклических радикалов включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пирролидинил, пирролидонил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, диазепинил, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил.

В некоторых вариантах осуществления два соседних заместителя на гетероциклическом кольце берутся вместе с общими кольцевыми атомами для необязательно замещенного конденсированного 5-6-членного ароматического или 3-8-членного неароматического кольца, имеющего 0-3 кольцевых гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Таким образом, термины "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклическое кольцо", "гетероциклическая группа", "гетероциклический остаток" и "гетероциклический радикал" используются здесь взаимозаменяемо и включают группы, в которых гетероциклическое кольцо является конденсированным с одним или несколькими арильными, гетероарильными или циклоалифатическими кольцами, такими как индолинил, 3Н-индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил, где радикал или точка присоединения находится на гетероциклическом кольце. Гетероциклическая группа может быть моно-, би-, три- или полициклической, предпочтительно, моно-, би- или трициклической, более предпочтительно, моно- или бициклической. Термин "гетероциклилалкил" относится к алкильной группе, замещенной гетероциклилом, где алкильные и гетероциклические части независимо являются необязательно замещенными.

Как здесь используется, термин "частично ненасыщенный" относится к кольцевому остатку, который содержит, по меньшей мере, одну двойную или тройную связь между кольцевыми атомами. Термин "частично ненасыщенный" предназначается для охвата колец, имеющих множество центров ненасыщенности, но не предназначен для включения в него арильных или гетероарильных остатков, как здесь определено.

Термины "галогеналифатическая группа", "галогеналкил", "галогеналкенил" и "галогеналкокси" относятся к алифатической, алкильной, алкенильной или алкоксигруппам, в качестве примера, которые могут быть замещенными одним или несколькими атомами галогена. Как здесь используется, термин "галоген" означает F, Cl, Br или I. Термин "фторалифатическая группа" относится к галогеналифатической группе, где галоген представляет собой фтор.

Термин "алкилен" относится к двухвалентной алкильной группе. "Алкиленовая цепь" представляет собой полиметиленовую группу, то есть $-(CH_2)_n-$, где n представляет собой положительное целое число, предпочтительно, от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или от 2 до 3. Замещенная алкиленовая цепь представляет собой полиметиленовую группу, в которой один или несколько атомов водорода метилена заменены заместителем. Соответствующие заместители включают те, которые описаны ниже для замещенной алифатической группы. Алкиленовая цепь также может быть замещенной в одном или нескольких положениях алифатической группой или замещенной алифатической группой.

Термин "замещенный", как здесь используется, означает, что водородный радикал обозначенного остатка заменен радикалом указанного заместителя, при условии, что замещение приводит к получению стабильного или химически осуществимого соединения. Фраза "один или несколько заместителей", как здесь используется, относится к некоторому количеству заместителей, которое составляет от одного до максимального количества возможных заместителей по отношению к количеству доступных центров связывания, при условии, что удовлетворяются указанные выше условия стабильности и химической осуществимости. Если не указано иного, необязательно замещенная группа может иметь заместители в каждом замещаемом положении группы и заместители могут быть либо одинаковыми, либо различными.

Арильная (включая арильный остаток в аралкиле, аралкокси, арилоксиалкиле и тому подобное) или гетероарильная (включая гетероарильный остаток в гетероаралкиле и гетероаралкокси и тому подобное) группа может содержать один или несколько заместителей. Примеры соответствующих заместителей на ненасыщенном атоме углерода арильной или гетероарильной группы включают -галоген, $-NO_2$, $-CN$, $-R^*$, $-C(R^*)=C(R^*)_2$, $-C\equiv C-R^*$, $-OR^*$, $-SR^*$, $-S(O)R^*$, $-SO_2R^*$, $-SO_3R^*$, $-SO_2N(R^+)_2$, $-N(R^+)_2$, $-NR^+C(O)R^*$, $-NR^+C(O)N(R^+)_2$, $-NR^+CO_2R^*$, $-O-CO_2R^*$, $-OC(O)N(R^+)_2$, $-O-C(O)R^*$, $-CO_2R^*$, $-C(O)-C(O)R^*$, $-C(O)R^*$, $-C(O)N(R^+)_2$, $-C(O)N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)-C(O)R^*$, $-C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-C(=NR^+)-OR^*$, $-N(R^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-NR^+SO_2R^*$, $-NR^+SO_2N(R^+)_2$, $-P(O)(R^*)_2$, $-P(O)(OR^*)_2$, $-O-P(O)-OR^*$ и $-P(O)(NR^+)-N(R^+)_2$; или два соседних заместителя, взятые вместе с их общими атомами, образуют 5-6-членное ненасыщенное или частично ненасыщенное кольцо, имеющее 0-3 кольцевых атома, выбранных из группы, состоящей из N, O и S.

Арильная (включая арильный остаток в аралкиле, аралкокси, арилоксиалкиле и тому подобное) или гетероарильная (включая гетероарильный остаток в гетероаралкиле и гетероаралкокси и тому подобное) группа может содержать один или несколько заместителей. Примеры соответствующих заместителей на ненасыщенном атоме углерода арильной или гетероарильной группы включают -галоген, $-NO_2$, $-CN$, $-R^*$, $-C(R^*)=C(R^*)_2$, $-C\equiv C-R^*$, $-OR^*$, $-SR^*$, $-S(O)R^*$, $-SO_2R^*$, $-SO_3R^*$, $-SO_2N(R^+)_2$, $-N(R^+)_2$, $-NR^+C(O)R^*$, $-NR^+C(O)N(R^+)_2$, $-NR^+CO_2R^*$, $-O-CO_2R^*$, $-OC(O)N(R^+)_2$, $-O-C(O)R^*$, $-CO_2R^*$, $-C(O)-C(O)R^*$, $-C(O)R^*$, $-C(O)N(R^+)_2$, $-C(O)N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)-C(O)R^*$, $-C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-C(=NR^+)-OR^*$, $-N(R^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-NR^+SO_2R^*$, $-NR^+SO_2N(R^+)_2$, $-P(O)(R^*)_2$, $-P(O)(OR^*)_2$, $-O-$

$P(O)-OR^*$ и $-P(O)(NR^+)-N(R^+)_2$; или два соседних заместителя, взятые вместе с их общими атомами, образуют 5-6-членное ненасыщенное или частично ненасыщенное кольцо, имеющее 0-3 кольцевых атома, выбранных из группы, состоящей из N, O и S.

Каждый R^+ независимо представляет собой атом водорода или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу, или два R^+ на одном и том же атоме азота, взятые вместе с атомом азота, образуют 5-8-членное ароматическое или неароматическое кольцо, имеющее в дополнение к атому азота 0-2 кольцевых гетероатома, выбранных из N, O и S. Каждый R^* независимо представляет собой атом водорода или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную или гетероциклическую группу. Каждый R° представляет собой необязательно замещенную алифатическую или арильную группу.

Алифатическая группа или неароматическое гетероциклическое кольцо может быть замещенным одним или несколькими заместителями. Примеры соответствующих заместителей на насыщенном атоме углерода алифатической группы или неароматического гетероциклического кольца включают, без ограничения, те, которые перечислены выше для ненасыщенного атома углерода арильной или гетероарильной группы, и следующие: $=O$, $=S$, $=C(R^*)_2$, $=N-N(R^*)_2$, $=N-OR^*$, $=N-NHC(O)R^*$, $=N-NHCO_2R^\circ$, $=N-NHSO_2R^\circ$ или $=N-R^*$, где каждый R^* и R° является таким, как определено выше.

Соответствующие заместители на атоме азота неароматического гетероциклического кольца включают $-R^*$, $N(R^*)_2$, $-C(O)R^*$, $-CO_2R^*$, $-C(O)-C(O)R^*$, $-C(O)CH_2C(O)R^*$, $-SO_2R^*$, $-SO_2N(R^*)_2$, $-C(=S)N(R^*)_2$, $-C(=NH)-N(R^*)_2$ и $-NR^*SO_2R^*$; где каждый R^* является таким, как определено выше.

Соединения формулы (I) являются ингибиторами Ауогоа-киназы. Соединения могут анализироваться *in vitro* или *in vivo* на их способность к связыванию и/или ингибированию Ауогоа-киназы. Анализы *in vitro* включают анализы, для определения ингибирования способности Ауогоа-киназы к фосфорилированию субстрата белка или пептида. Альтернативные анализы *in vitro* количественно определяют способность соединения к связыванию Ауогоа-киназы. Связывание ингибитора может измеряться посредством радиоактивного мечення ингибитора перед связыванием, выделения комплекса ингибитор/Ауогоа-киназа и определения количества связанных радиоактивных меток.

Альтернативно, связывание ингибитора может определяться посредством осуществления конкурентного эксперимента, в котором новые ингибиторы инкубируют вместе с Ауогоа-киназой, связанной с известным радиоактивным лигандом. Соединения по настоящему изобретению также могут анализироваться на их способность к влиянию на клеточные или физиологические функции, опосредуемые активностью Ауогоа-киназы. Анализы на каждую из этих активностей описываются в примерах и/или известны из литературы.

В другом аспекте, следовательно, настоящее изобретение предусматривает способ ингибирования активности Ауогоа-киназы в клетке, включающий приведение в контакт клетки, в которой является желательным ингибирование Ауогоа-киназы, с ингибитором Ауогоа-киназы формулы (I) или его фармацевтически приемлемой солью.

Предпочтительно, способ в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения вызывает ингибирование пролиферации клеток для контактирующих клеток. Фраза "ингибирование пролиферации клеток" используется для обозначения способности ингибитора Ауогоа-киназы к ингибированию количества клеток или роста клеток для контактирующих клеток, по сравнению с клетками, не контактирующими с ингибитором. Оценка пролиферации клеток может осуществляться посредством отсчета клеток с использованием устройства для подсчета клеток или с помощью анализа выживаемости клеток, например, анализы BrdU, MTT, ХТТ или WST. Когда клетки находятся в состоянии непрерывного роста (например, твердая опухоль или орган), такая оценка пролиферации клеток может осуществляться посредством измерения роста, например, с помощью штангенциркуля, и сравнения величины роста контактирующих и неконтактирующих клеток.

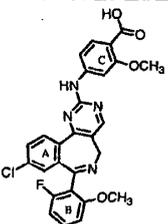
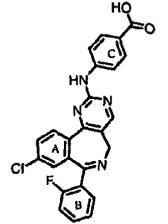
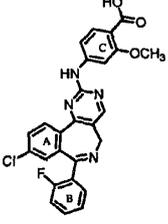
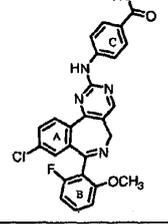
Предпочтительно, рост клеток, контактирующих с ингибитором, замедляется по меньшей мере примерно на 50% по сравнению с ростом неконтактирующих клеток. В различных вариантах осуществления пролиферация для контактирующих клеток ингибируется, по меньшей мере, примерно на 75% по меньшей мере примерно на 90% или по меньшей мере примерно на 95% по сравнению с неконтактирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления фраза "ингибирование пролиферации клеток" включает уменьшение количества контактирующих клеток, по сравнению с неконтактирующими клетками, вступившими в контакт. Таким образом, ингибитор Ауогоа-киназы, который ингибирует пролиферацию клеток у контактирующей клетки, может вызывать замедление роста контактирующей клетки, приостанавливать рост, вызывать запрограммированную гибель клеток (то есть, апоптоз) или вызывать некротическую гибель клеток.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединения формулы (I), которые характеризуются метоксизаместителем в орто-положении по отношению к карбоксильной группе в кольце С, и заместителем R^b , иным, чем атом водорода в кольце В, демонстрируют неожиданную активность в клеточных анализах по сравнению со структурно сходными соединениями.

Например, таблица 2 показывает сравнение соединения 1 с соединениями i, ii и iii, описанными в публикации заявки на международный патент WO 05/111039, Claiborne et al. Соединения 1 и i-iii иссле-

дуют в трех клеточных анализах: (1) анализ аутофосфорилирования Аугога А в рТ288; (2) анализ пролиферации клеток с BrdU (5-бром-2-деоксиуридином) для клеток НСТ116; и (3) анализ пролиферации клеток с BrdU для клеток SW480. Протоколы этих анализов известны в данной области и описываются в примере 6. Соединения i и ii демонстрируют очень сходную активность во всех трех анализах, и это говорит о том, что добавление метокси заместителя в орто-положении по отношению к заместителю карбоновой кислоты в кольце С оказывает только малое влияние на активность по отношению к клеткам или вообще его не оказывает. В противоположность этому, соединение iii демонстрирует значительно улучшенную активность во всех трех анализах, по сравнению с соединением ii, и это говорит о том, что дополнительный заместитель на кольце В улучшает активность. Принимая во внимание эти данные, тот факт, что соединение 1 является более активным, чем соединения i и ii, не является неожиданным. Неожиданно, однако, соединение 1 демонстрирует также заметное 2-4-кратное увеличение активности по сравнению с соединением iii. Как показывают эти данные, сочетание метоксизаместителя в орто-положении по отношению к заместителю карбоновой кислоте и к заместителю R^b, иному, чем атом водорода в кольце В, обеспечивает неожиданное увеличение активности.

Таблица 2. Клеточная активность ингибиторов Аугога -киназы

Соединение	Структура	рТ288 IC ₅₀ (мкМ)	BrdU НСТ116 LD ₅₀ (мкМ)	BrdU SW480 LD ₅₀ (мкМ)
1		0.005	0.03	0.41
i		0.18	0.707	6.502
ii		0.15	0.758	7.579
iii		0.018	0.13	0.94

Соединение 1 является также более активным, чем соединение iii *in vivo*, как демонстрируется на модели мышей с привитой карциномой толстой кишки человека НСТ116 (см. пример 7). Повышение активности *in vivo* соединений формулы (I), как ожидается, приведет к улучшению терапевтического индекса по отношению к нецелевым побочным воздействиям.

В другом аспекте, следовательно, настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

Если в этих композициях используется фармацевтически приемлемая соль соединения по настоящему изобретению, соль предпочтительно получают из неорганической или органической кислоты или основания. Относительно обзора соответствующих солей, см., например, Berge et al., *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977) и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., ed. A. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Неограничивающие примеры соответствующих кислотно-аддитивных солей включают следующие: ацетат, адипат, альгинат, аспаргат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, fumarат, лукогептаноат, глицерофосфат, хемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеканат.

Соответствующие аддитивные соли с основаниями включают, без ограничения, соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия и калия, соли щелочно-земельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли с органическими основаниями, такие как дициклогексилламин, N-метил-D-глюкамин, трет-бутиламин, этилендиамин, этаноламин и холин, и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и так далее. В одном из вариантов осуществления соединение формулы (1) может приготавливаться как соответствующая натриевая соль.

Также основные азотсодержащие группы могут кватернизироваться с помощью таких агентов как низшие алкилгалогениды, такие как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, -бромиды и -йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфаты, длинноцепные галогениды, такие как децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, -бромиды и -йодиды, аралкилгалогениды, такие как бензил и фенэтилбромиды, и другие. При этом получают продукты, растворимые или диспергируемые в воде или масле.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" используется здесь для упоминания материала, который совместим с субъектом, его принимающим, предпочтительно млекопитающим, более предпочтительно с человеком, и является пригодным для доставки активного агента к мишени без прекращения активности агента. Токсичность или отрицательное воздействие, если оно имеется, связанное с носителем, предпочтительно является совместимым с разумным отношением риск/выгода для предполагаемого использования активного агента.

Термины "носитель", "вспомогательное вещество" или "основа" используются здесь взаимозаменяемо и включают любые и все растворители, разбавители и другие жидкие основы, вспомогательные вещества для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загущающие или эмульсифицирующие агенты, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и тому подобное, в соответствии с конкретной желаемой дозируемой формой. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., ed. A. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, описывает различные носители, используемые при приготовлении фармацевтически приемлемых композиций, и известные технологии для их приготовления. За исключением того случая, когда любая обычная среда носитель является несовместимой с соединениями по настоящему изобретению, например, из-за оказания какого-либо нежелательного биологического воздействия или иного взаимодействия вредным образом с любым другим компонентом (компонентами) фармацевтически приемлемой композиции, его использование, как предполагается, находится в рамках настоящего изобретения. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но не ограничиваясь этим, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как динатрий гидрофосфат, калий гидрофосфат, карбонат натрия, бикарбонат натрия, карбонат калия, бикарбонат калия, гидроксид магния и гидроксид алюминия, глицин, сорбиновую кислоту или сорбат калия, частичные глицериды насыщенных растительных жирных кислоты, воду, не содержащую пирогенов воду, соли или электролиты, такие как протамин сульфат, динатрий гидрофосфат, калий гидрофосфат, хлорид натрия и соли цинка, коллоидный оксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, шерстяной жир, сахара, такие как лактоза, глюкоза, сахароза, крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал, целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы, порошкообразная смола трагаканта; солод, желатин, тальк, наполнители, такие как масло какао и воски для суппозиторий, масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, масло сафлвера, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло, гликоли, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат, агар, альгиновую кислоту, изотонический солевой раствор, раствор Рингера, спирты, такие как этанол, изопропиловый спирт, гексадециловый спирт и глицерин, циклодекстрины, смазывающие вещества, такие как натрий-лаурилсульфат и стеарат магния, углеводороды нефти, такие как минеральное масло и петролатум. Красящие агенты, агенты для облегчения высвобождения, агенты для покрытий, подслащивающие, ароматизирующие и парфюмерные агенты, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композиции, в соответствии с суждением того, кто ее приготавливает.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области, такими как обычные способы гранулирования, смешивания, растворения, инкапсулирования, лиофилизации или эмульсификации, среди прочего. Композиции могут быть получены в различных формах, включая гранулы, преципитаты или частицы, порошки, включая порош-

ки, высушенные вымораживанием, высушенные на роторном испарителе или высушенные распылением, аморфные порошки, таблетки, капсулы, сиропы, суппозитории, инъекции, эмульсии, эликсиры, суспензии или растворы. Препараты могут необязательно содержать растворители, разбавители и другие жидкие основы, вспомогательные вещества для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные агенты, модификаторы pH, изотонические агенты, загущающие или эмульсифицирующие агенты, стабилизаторы и консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и тому подобное, в соответствии с конкретной желаемой дозированной формой.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиции по настоящему изобретению приготавливаются для фармацевтического введения млекопитающему, предпочтительно человеческому существу. Такие фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться перорально, парентерально, посредством спрея для ингаляций, местным образом, ректально, назально, буккально, вагинально или посредством имплантированного резервуара. Термин "парентеральный", как здесь используется, включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, интраартикулярную, интрасиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутривенную, внутрипеченочную, внутриранеую и внутричерепную инъекцию или методики вливаний. Предпочтительно, композиции вводят перорально, внутривенно или подкожно. Препараты по настоящему изобретению могут составляться таким образом, чтобы они были быстродействующими, быстро высвобождаемыми или представляли собой препараты с продолжительным действием. Кроме того, соединения могут вводиться скорее с помощью локальных, чем системных средств, например посредством введения (например, с помощью инъекции) в опухоль.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают, но не ограничиваясь этим, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, повсеместно используемые в данной области, такие, например, как вода или другие растворители, солюбилизирующие агенты и эмульсификаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, циклодекстрины, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло из зародышей семян, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сложные сорбитановые эфиры жирных кислот, и их смеси. Наряду с инертными разбавителями, пероральные композиции могут также содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульсифицирующие и суспендирующие агенты, подслащивающие, ароматизирующие и парфюмерные агенты.

Препараты для инъекций, например стерильные, водные или масляные суспензии, могут приготавливаться в соответствии с современным уровнем техники с использованием соответствующих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор, суспензию или эмульсию для инъекций, в нетоксичном парентеральном приемлемом разбавителе или растворителе, например, таком как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых основ и растворителей, которые могут использоваться, находятся вода, раствор Рингера, U.S.P. (Фармакопея США) и изотонический раствор хлорида натрия. В дополнение к этому, стерильные, фиксированные масла обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может использоваться любое смягчающее фиксированное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. В дополнение к этому, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, используются при приготовлении препаратов для инъекций. Препараты для инъекций могут стерилизоваться, например, с помощью фильтрации через фильтр, удерживающий бактерии, или посредством включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые могут растворяться или диспергироваться в стерильной воде или в другой стерильной среде для инъекций перед использованием. Композиции, приготавливаемые для парентерального введения, могут вводиться посредством инъекции болюса или посредством выдавливания с заданным временным графиком или могут вводиться с помощью непрерывного вливания.

Для пролонгирования воздействия соединения по настоящему изобретению часто является желательным замедление поглощения соединения от подкожной или внутримышечной инъекции. Это может достигаться посредством использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. При этом скорость поглощения соединения зависит от скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и от кристаллической формы. Альтернативно, замедленное поглощение парентерально вводимой формы соединения осуществляют посредством растворения или суспендирования соединения в масляной основе. Формы депо для инъекций получают посредством формирования микроинкапсулирующих матриц соединения в биологически деградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения соединения к полимеру и от природы конкретного используемого полимера, скорость высвобождения соединения может контролироваться. Примеры других биологически деградируемых полимеров включают сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Препараты депо для инъекций также получают посредством захвата соединения в липосомах или микроэмульсиях, которые являются совместимыми с тканями тела.

Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой

суппозитории, которые могут быть получены посредством смешивания соединений по настоящему изобретению с соответствующими нераздражающими наполнителями или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозиториев, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела, и по этой причине плавятся в заднем проходе или в вагинальной полости и высвобождают активное соединение.

Твердые дозированные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых дозированных формах активное соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным, фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем, таким как цитрат натрия или дикальций фосфат и/или а) начинками или агентами для придания объема, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннитол и кремниевая кислота, б) со связующими веществами, такими, например, как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и аравийская камедь, с) со смачивающими веществами, такими как глицерин, d) с разрыхляющими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, крахмал из картофеля или тапиоки, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия, e) с агентами, замедляющими растворение, такими как парафин, f) с ускорителями поглощения, такими как соединения четвертичного аммония, g) со смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и глицерин моностеарат, h) с поглотителями, такими как каолин и бентонитная глина, и i) со смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрий-лаурилсульфат и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль, дозированная форма также может содержать буферные агенты, такие как фосфаты или карбонаты.

Твердые композиции подобных типов могут также использоваться в качестве начинки в мягких и твердых желатиновых капсулах с начинкой, с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное. Твердые дозированные формы в таблетках, драже, капсулах, пилюлях и гранулах могут быть получены с помощью покрытий и оболочек, таких как энтеральные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать замутняющие агенты и могут также иметь такую композицию, что они высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только или преимущественно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой по времени. Примеры заключающих композиций, которые могут использоваться, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции сходных типов могут также использоваться в качестве начинки в мягких и твердых желатиновых капсулах с начинкой, с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей, и тому подобное.

Активные соединения могут также находиться в микроинкапсулированной форме вместе с одним или несколькими наполнителями, как отмечено выше. Твердые дозированные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть получены вместе с покрытиями и оболочками, такими как энтеральные покрытия, покрытия для контроля высвобождения и другие покрытия, хорошо известные в области приготовления фармацевтических препаратов. В таких твердых дозированных формах активное соединение может смешиваться, по меньшей мере, с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие дозированные формы могут также содержать, в соответствии с обычной практикой, дополнительные вещества, иные, чем инертные разбавители, например, таблетирующие смазывающие вещества и другие таблетирующие вспомогательные вещества, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль, дозированные формы могут также содержать буферные агенты. Они могут необязательно содержать замутняющие агенты и также могут иметь такую композицию, что они высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только или преимущественно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой во времени. Примеры заключающих композиций, которые могут использоваться, включают полимерные вещества и воски.

Дозированные формы для местного или трансдермального введения соединения по настоящему изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингалянты или пластыри. Активный компонент смешивается при стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, по потребности. Офтальмологический препарат, капли для ушей и капли для глаз также рассматриваются как находящиеся в рамках настоящего изобретения. В дополнение к этому, настоящее изобретение предполагает использование трансдермальных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество обеспечения контролируемой доставки соединения в организм. Такие дозированные формы могут быть получены посредством растворения или распределения соединения в соответствующей среде. Усилители поглощения могут также использоваться для увеличения потока соединения через кожу. Скорость может контролироваться либо посредством создания мембраны, контролирующей скорость, либо посредством диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются особенно полезными в терапевтических применениях, относящихся к расстройству, опосредуемому Аугога-киназой. Как здесь используется, термин "расстройство, опосредуемое Аугога-киназой", включает любое расстройство, забо-

ление или состояние, которое вызывается или отличается увеличением экспрессии или активности Аюгога-киназы или которое требует активности Аюгога-киназы. Термин "расстройство, опосредуемое Аюгога-киназой", также включает любое расстройство, заболевание или состояние, при котором ингибирование активности Аюгога-киназы является выгодным. Расстройства, опосредуемые Аюгога-киназой, включают пролиферативные расстройства. Неограничивающие примеры пролиферативных расстройств включают хронические воспалительные пролиферативные расстройства, например псориаз и ревматоидный артрит; пролиферативные расстройства глаз, например диабетическую ретинопатию; злокачественные пролиферативные расстройства, например гемангиомы; и рак.

Предпочтительно, композицию приготавливают для введения пациенту, имеющему расстройство, опосредуемое Аюгога-киназой, или риск их развития, или испытывающему его рецидив. Термин "пациент", как здесь используется, означает животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Предпочтительные фармацевтические композиции по настоящему изобретению представляют собой композиции, приготовленные для перорального, внутривенного или подкожного введения. Однако любая из указанных выше дозированных форм, содержащих терапевтически эффективное количество соединения по настоящему изобретению, находится в рамках рутинных экспериментов и по этой причине в рамках настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать другой терапевтический агент.

Предпочтительно такой другой терапевтический агент представляет собой агент, обычно вводимый пациентам с тем заболеванием или состоянием, которое лечится.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество, достаточное, чтобы вызвать детектируемое уменьшение активности Аюгога-киназы или тяжести расстройства, опосредуемого Аюгога-киназой. Необходимое количество ингибитора Аюгога-киназы будет зависеть от эффективности ингибитора для данного типа клеток и от продолжительности времени, необходимого для лечения расстройства. Необходимо также понять, что конкретная доза и режим лечения для любого конкретного пациента будет зависеть от разнообразных факторов, включая активность конкретного используемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента, время введения, скорость экскретирования, сочетания лекарственных средств, суждения лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, которое лечится. Количество дополнительного терапевтического агента, присутствующего в композиции по настоящему изобретению, как правило, будет не больше, чем то количество, которое обычно вводилось бы в композиции, содержащей этот терапевтический агент в качестве единственного активного агента.

Предпочтительно, количество дополнительного терапевтического агента будет находиться в пределах от примерно 50% до примерно 100% от количества, обычно присутствующего в композиции, содержащей этот агент как единственный терапевтически активный агент.

Композиции по настоящему изобретению могут приготавливаться в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и однородности дозирования. Выражение "стандартная дозированная форма", как здесь используется, относится к физически отдельной единице агента, соответствующей пациенту, который должен лечиться. Будет понятно, однако, что общее ежедневное потребление соединений и композиций по настоящему изобретению будет определяться наблюдающим врачом в рамках апробированного медицинского суждения. Стандартная дозированная форма для парентерального введения может находиться в ампулах или в контейнерах с множеством доз.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения пациента, страдающего расстройством, опосредуемым Аюгога-киназой, или с риском его развития, или испытывающего его рецидив. Способ включает стадию введения пациенту соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Соединения и фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут использоваться для достижения полезного терапевтического или профилактического воздействия, например, на пациента с пролиферативным расстройством, как обсуждалось выше. Соединения и фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются особенно полезными для лечения рака.

Как здесь используется, термин "рак" относится к клеточному расстройству, отличающемуся неконтролируемой или нерегулируемой пролиферацией клеток, пониженной клеточной дифференциацией, аномальной способностью вторгаться в окружающую ткань и/или способностью устанавливать новый рост в эктопических местах. Термин "рак" включает, но, не ограничиваясь этим, твердые опухоли и кровяные опухоли. Термин "рак" охватывает заболевания кожи, тканей, органов, костей, хрящей, крови и сосудов. Термин "рак" дополнительно охватывает первичные и метастатические раковые заболевания.

Неограничивающие примеры твердых опухолей, которые могут лечиться с помощью способов по настоящему изобретению, включают рак поджелудочной железы; рак мочевого пузыря; колоректальный рак; рак груди, включая метастатический рак груди; рак простаты, включая андроген-зависимый и андроген-независимый рак простаты; ренальный рак, включая, например, метастатическую карциному ренальных клеток; гепатоцеллюлярный рак; рак легких, включая, например, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), бронхиоло-альвеолярную карциному (BAC) и аденокарциному легких; рак яичников, включая, например, прогрессирующий эпителиальный или первичный перитонеальный рак; рак шейки матки; рак

желудка; рак пищевода; рак головы и шеи, включая, например, карциному сквамозных клеток головы и шеи; меланому; нейроэндокринный рак, включая метастатические нейроэндокринные опухоли; опухоли мозга, включая, например, глиому, анапластическую олигодендроглиому, мультиформную глиобластому взрослых и анапластическую астроцитому взрослых; рак костей и саркому мягких тканей.

В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное образование. Неограничивающие примеры гематологического злокачественного образования включают острую миелоидную лейкемию (AML); хроническую миелогенную лейкемию (CML), включая ускоренную CML и бластическую фазу CML (CML-BP); острую лимфобластную лейкемию (ALL); хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL); болезнь Ходжкина (HD); лимфому не-Ходжкина (NHL), включая фолликулярную лимфому и лимфому клеток мантийной зоны; лимфому В-лимфоцитов; лимфому Т-лимфоцитов; множественную миелому (MM); макроглобулинемию Вальденстрома; миелодиспластические синдромы (MDS), включая рефрактерную анемию (RA), рефрактерную анемию с кольцевидными сидеробластами (RARS), рефрактерную анемию с избытком бластов (RAEB) и RAEB при трансформации (RAEB-T); и миелопролиферативные синдромы.

В некоторых вариантах осуществления соединения или композиция по настоящему изобретению используются для лечения ракового заболевания, при котором увеличивается активность Аугога-киназы. В некоторых вариантах осуществления соединения или композиция по настоящему изобретению используются для лечения пациента, имеющего рак или риск его развития или испытывающего рецидив рака, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, рака яичников, рака груди, рака желудка, рака простаты и рака поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак выбирается из группы, состоящей из рака груди, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Аугога-киназы по настоящему изобретению вводят в сочетании с другим терапевтическим средством. Другое терапевтическое средство может также ингибировать Аугога-киназу или может работать по другому механизму. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой такое средство, которое обычно вводят пациентам с тем заболеванием или состоянием, которое лечится. Ингибитор Аугога-киназы по настоящему изобретению может вводиться вместе с другими терапевтическими средствами в одной и той же дозированной форме или как отдельная дозированная форма. Когда он вводится как отдельная дозированная форма, другое терапевтическое средство может вводиться до введения ингибитора Аугога-киназы по настоящему изобретению, вместе с ним или после него.

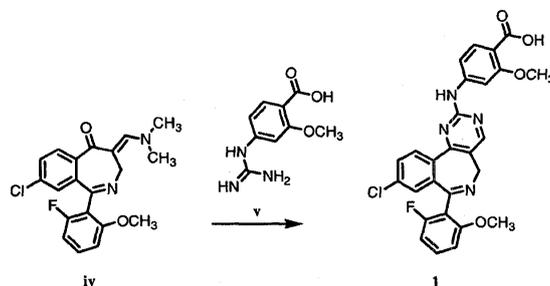
В некоторых вариантах осуществления ингибитор Аугога-киназы по настоящему изобретению вводят в сочетании с терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из цитотоксических агентов, радиационной терапии и иммунотерапии. Неограничивающие примеры цитотоксических агентов, пригодных для использования в сочетании с ингибиторами Аугога-киназы по настоящему изобретению, включают антиметаболиты, включая, например, капецитибин, гемцитабин, 5-фторурацил или 5-фторурацил/лейковорин, флударабин, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и метотрексат; ингибиторы топоизомеразы, включая, например, этопозид, тенипозид, камптотецин, топотекан, иринотекан, доксорубин и даунорубин; алкалоиды винка, включая, например, винкристин и винбластин; таксаны, включая, например, паклитаксель и доцетаксель; агенты на основе платины, включая, например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; антибиотики, включая, например, актиномицин D, блеомицин, митомицин C, адриамицин, даунорубин, идарубин, доксорубин и пегилированный липосомальный доксорубин; алкилирующие агенты, такие как мельфалан, хлорамбуцил, бусульфид, тиотепа, ифосфамид, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, декарбазин и циклофосфамид; талидомид и родственные аналоги, включая, например, CC-5013 и CC-4047; ингибиторы белковой тирозинкиназы, включая, например, иматиниб мезилат и gefitinib; антитела, включая, например, трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб и бевацизумаб; митоксантрон; дексаметазон; преднизон и темозоломид.

Для того чтобы настоящее изобретение было понято более полно, приводятся следующие примеры получения и исследования. Эти примеры иллюстрируют, как получать или исследовать конкретные соединения, и не должны рассматриваться как ограничивающие рамки настоящего изобретения каким-либо образом.

Примеры

Определения	
AcOH	уксусная кислота
ATP	аденозин трифосфат
BrdU	5-бром-2'-деоксиуридин
BSA	Бычий сывороточный альбумин
DCM	дихлорметан
DMSO	диметилсульфоксид
DTT	дитиотреитол
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
EtOH	этанол
HPβCD	гидроксипропил бета-циклодекстрин
MeOH	метанол
MTT	метилтиазолтетразолий
WST	(натриевая соль 4-[3-(4-йодфенил)-2-(4-нитрофенил)-2Н-5-тетразолио]-1,3-бензолдисульфоната)
PKA	сАМР-зависимая протеинкиназа
THF	тетрагидрофуран
h	часы
min	минуты
m/z	отношение массы к заряду
MS	масс-спектр
HRMS	масс-спектр высокого разрешения

Температуры плавления определяют на капиллярном устройстве для определения температуры плавления MEL-TEMP II и не корректируют. Спектр ^1H ЯМР регистрируют на спектрометре Bruker Avance 400. Масс-спектры получают на спектрометре Waters ZQ 2000 (капилляр 3,5 кВ, конус 30 В). Элементный анализ осуществляют с помощью Atlantic Microlab.



Пример 1. Получение 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибзойной кислоты (1).

8-Хлор-4-[(диметиламино)метилден]-1-(2-фтор-6-метоксифенил)-3,4-дигидро-5Н-2-бензазепин-5-он (iv) может быть получен, как описано в Claiborne et al., публикация патента США 2005-256102. 4-{{Амино(имино)метил}амино}-2-метоксибзойная кислота·HCl (v) может быть получена способом, подобным тому, что описан в Sugiki et al., публикация заявки на Международный патент WO 01/042199.

Метанол (50,0 мл) добавляют к iv (2,39 г, 6,42 ммоль), v (1,77 г, 7,21 ммоль) и карбонату калия-1,5 [H₂O] (2,65 г, 16,0 ммоль) в 100-мл круглодонной колбе, снабженной брусковой мешалкой и обратным холодильником. Реакционную смесь перемешивают и нагревают с обратным холодильником в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой (450 мл) и подкисляют до pH 1 с помощью 1н. HCl. Добавляют диэтиловый эфир (200 мл) и смесь перемешивают в течение 15 мин. Полученный осадок собирают с помощью фильтрования и очищают с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (NH₄OH:MeOH:DCM, от 0,5:5:94,5 до 2:20:78), с получением аммониевой соли в виде желто-коричневого твердого продукта. Твердый продукт суспендируют в воде (100 мл) и при быстром перемешивании добавляют 1н. HCl до установления pH 1. Смесь перемешивают в течение приблизительно 30 мин, а затем добавляют простой диэтиловый эфир (50 мл) и этилацетат (5 мл), и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение приблизительно 1 ч. Продукт собирают на воронке с пористым фильтром (с мелкими порами), промывают водой (50 мл) и простым диэтиловым эфиром (50 мл) и сушат в вакууме при 40°C в течение ночи, с получением 1,65 г (выход 50%) 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибзойной кислоты (1).

^1H ЯМР (DMSO-d₆) δ 12,08 (с, 1H), 10,23 (с, 1H), 8,72 (с, 1H), 8,29 (д, 1H), 7,95 (ушир. с, 1H), 7,80

(дд, 1H), 7,70 (д, 1H), 7,4-7,35 (м, 2H), 7,21 (ушир. с, 1H), 6,9 (ушир. с, 2H), 4,9 (ушир. с, 1H), 3,9 (ушир. с, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,3 (ушир. с, 3H); MS m/z 519 (M⁺+H, 100%).

Соединения 2-18 получают с помощью способов, аналогичных тем, которые описаны для соединения 1 или описаны в Claiborne et al., публикация WO 05/111039.

Пример 2. Получение полиморфной формы 1 натрия 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-д][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибензоата.

К перемешиваемой суспензии 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-д][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибензойной кислоты (98,0 г, 190 ммоль) в этаноле (2,0 л) добавляют 1,044 М гидроксида натрия в воде (199 мл). Полученный гомогенный раствор перемешивают в течение 1 ч, в течение этого времени формируется густой осадок. Продукт собирают с помощью фильтрования и промывают этанолом (0,5 л) и простым диэтиловым эфиром (1,0 л). Полученный твердый продукт сушат в вакууме при 60-70°C в течение 4 дней, с получением 88,6 г (86,8%) натрия 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-д][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибензоата в виде светлого желто-коричневого твердого продукта, т.пл. 225°C (разложение).

¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 9,86 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,29 (д, 1H), 7,79 (дд, 1H), 7,60 (ушир. с, 1H), 7,40 (дд, 1H), 7,29 (д, 1H), 7,25-7,15 (м, 2H), 6,9 (ушир. с, 2H), 4,9 (ушир. с, 1H), 3,8 (ушир. с, 1H), 3,70 (с, 3H), 3,35 (ушир. с, 3H); MS m/z 519 (M⁺-Na+H, 100%); CHN Анал. вычисл. для C₂₇H₁₉ClFN₄NaO₄ 0,33 EtOH 1,3 H₂O: C, 57,33; H, 4,10; N, 9,67. Найдено: C, 57,14; H, 3,99; N, 9,65.

Пример 3. Получение полиморфной формы 2 натрия 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-д][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибензоата.

Полиморфную форму 1 натрия 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-д][2]бензазепин-2-ил}амино}-2-метоксибензоата (100 мг) суспендируют в воде (0,2 мл) и этаноле (2 мл), и смесь перемешивают при нагреве при 70°C в течение 6 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры и светло-желтый твердый продукт собирают на воронке с пористым фильтром и сушат в вакууме при 70°C в течение 3 дней, с получением 70 мг кристаллической полиморфной формы 2, т.пл. 2 65°C.

¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ: 9,86 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,29 (д, 1H), 7,79 (дд, 1H), 7,60 (ушир. с, 1H), 7,40 (дд, 1H), 7,29 (д, 1H), 7,25-7,15 (м, 2H), 6,9 (ушир. с, 2H), 4,9 (ушир. с, 1H), 3,8 (ушир. с, 1H), 3,70 (с, 3H), 3,35 (ушир. с, 3H). MS m/z 519 (M⁺-Na+H, 100%).

Пример 4. Экспрессирование и очистка ферментов протеинкиназ.

Экспрессирование и очистка фермента Аугога А.

Рекомбинантный Аугога А мышей с гексагистидиновым тэгом на N-конце (His-Аугога А) экспрессируют с использованием стандартного вектора бакуловируса и систему экспрессирования клеток насекомых (Vac-to-Vac®, Invitrogen).

Растворимый рекомбинантный Аугога А мышей очищают от клеток насекомых с использованием агарозы Ni-NTA (Qiagen), как описывает производитель, и дополнительно очищают на эксклюзионной колонке S75 (Amersham Pharmacia Biotech).

Экспрессирование и очистка фермента Аугога В.

Рекомбинантный Аугога В мышей с гексагистидиновым тэгом на аминном окончании (His-Аугога В) экспрессируют с использованием стандартного вектора бакуловируса и системы экспрессирования клеток насекомых (Vac-to-Vac®, Invitrogen).

Растворимый рекомбинантный Аугога В мышей очищают от клеток насекомых с использованием агарозы Ni-NTA (Qiagen), как описывает производитель.

Пример 5. Анализы фермента протеинкиназы.

Анализ Аугога А киназы DELFIA®.

Реакционная смесь с ферментом Аугога А мышей составляет в целом 25 мкл и содержит 25 мМ Tris-HCl (pH 8,5), 2,5 мМ MgCl₂, 0,05% Surfact-AMPS-20, 5 мМ фторида натрия, 5 мМ DTT, 1 мМ АТР, 3 мкМ пептидного субстрата (биотин-β-Ala-QTRRKSTGGKAPR-NH₂) и 0,5 нМ рекомбинантного фермента Аугога А мышей. Ферментативную реакцию смесь с исследуемым соединением и без него инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре до завершения реакции с помощью 100 мкл стоп-буфера (1% BSA, 0,05% Surfact-AMPS-20 и 100 мМ EDTA). В целом 100 мкл ферментативной реакционной смеси переносят в лунки 96-луночного планшета, покрытого нейтравидином (Pierce), и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Лунки промывают промывочным буфером (25 мМ Tris, 150 мМ хлорида натрия и 0,1% Tween 20) и инкубируют в течение 1 ч вместе с 100 мкл реакционной смеси антитела, содержащей 1% BSA, 0,05% Surfact-AMPS-20, поликлональное антитело анти-фосфо-РКА кролика (1:2000, New England Biolabs) и меченный европием IgG анти-кролик (1:2000, Perkin Elmer). Лунки промывают, а затем связанный европий высвобождают с использованием 100 мкл Enhancement Solution (Perkin Elmer). Количественное определение европия осуществляют с использованием Wallac™ En Vision (Perkin Elmer).

Анализ Аугога В киназы DELFIA®.

Реакционная смесь с ферментом Аугога В, которая составляет в целом 25 мкл, содержит 25 мМ Tris-HCl (pH 8,5), 2,5 мМ MgCl₂, 0,025% Surfact-AMPS-20 (Pierce), 1% глицерина, 1 мМ DTT, 1 мМ АТР, 3

мкМ пептидного субстрата (биотин- β -Ala-QTRRKSTGGKAPR-NH₂) и 20 нМ рекомбинантного фермента Аугога В мышей. Ферментативную реакционную смесь с исследуемым соединением и без него инкубируют в течение 3 ч при комнатной температуре до завершения реакции с помощью 100 мкл стоп-буфера (1% BSA, 0,05% Surfact-AMPS-20 и 100 мМ EDTA). В целом 100 мкл ферментативной реакционной смеси переносят в лунки 96-луночного планшета, покрытого нейтравидином (Pierce), и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Лунки промывают промывочным буфером (25 мМ Tris, 150 мМ хлорида натрия и 0,1% Tween 20) и инкубируют в течение 1 часа вместе с 100 мкл реакционной смеси антитела, содержащей 1% BSA, 0,05% Surfact-AMPS-20, поликлональное антитело анти-фосфо-РКА кролика (1:2000, New England Biolabs) и меченный европием IgG антикролик (1:2000, Perkin Elmer). Лунки промывают, а затем связанный европий высвобождают с использованием 100 мкл Enhancement Solution (Perkin Elmer). Количественное определение европия проводят с использованием Wallac™ En Vision (Perkin Elmer).

Пример 6. Клеточный анализ.

Анализ аутофосфорилирования Аугога А рТ288.

Клетки опухоли человека (НСТ-116, получают от ATCC) выращивают в 96-луночных планшетах в среде МакКоя 5А, дополненной 10% фетальной сывороткой теленка и 200 нМ L-глутамин. После инкубирования среду роста заменяют 75 мкл свежей среды, и добавляют 25 мкл исследуемого соединения к клеткам при двукратных последовательных разбавлениях в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения конечных концентраций в пределах от 5 до 0,010 мкМ. Исследуемое соединение при каждом разбавлении добавляют одинаковым образом в 4 ряда на чашке и добавляют ДМСО (20 нМ) в каждую лунку двух столбцов для нелеченых контролей. Клетки обрабатывают исследуемым соединением или ДМСО в течение 60 мин при 37°C в увлажняемой камере для культуры клеток. Затем клетки фиксируют с помощью 4% параформальдегида в фосфатном солевом буфере (PBS) в течение 10 мин, пропитывают 0,5% Triton X-100 в PBS в течение 10 мин и промывают дважды PBS.

Клетки пропитывают антителом кролика Phospho-Auogo 2/AIK (T288) (1:60) и антителом мыши Anti-phospho-Ser/Thr-Pro MPM2 (1:750), затем конъюгированным с Alexa 488 IgG козы анти-кролик (1:180) и конъюгированным с Alexa 594 IgG курицы анти-мышь (1:180; Molecular Probes). Затем клетки окрашивают конъюгированным с Alexa 488 IgG курицы анти-коза (1:180, Molecular Probes) и Hoechst (1:50000). Клетки визуализируются с использованием Discovery-1 High Content Imaging System.

Изображения от девяти или шестнадцати мест на лунку захватываются при увеличении 200X. Ингибирование Аугога А определяют посредством измерения интенсивности флюоресценции рТ288 (аутофосфорилирование Аугога А) внутри иммуноположительных (митотических) клеток MPM2 с использованием программного обеспечения Metamorph. Кривые отклика на концентрацию генерируются посредством вычисления уменьшения интенсивности флюоресценции рТ288 в образцах, обработанных исследуемым соединением, по сравнению с контролями, обработанными ДМСО, и значения ингибирования роста (IC₅₀) определяют по этим кривым.

Все соединения 1-28 демонстрируют в этом анализе значения IC₅₀, равные или меньшие, чем 0,03 мкМ. Соединения 1-8 демонстрируют в этом анализе значения IC₅₀, равные или меньшие, чем 0,01 мкМ.

Анализ пролиферации клеток с помощью BrdU.

Пролиферацию клеток в каждой линии клеток измеряют с использованием иммуносорбентного анализа со связанным ферментом (ELISA) для наблюдения пролиферации клеток, колориметрического набора с 5-бром-2'-дезоксинуридином (BrdU) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ измеряет пролиферацию клеток посредством количественного определения инкорпорирования BrdU в реплицирующуюся дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Вкратце, каждую лунку инкубируют вместе с 10 мкл метящего реагента BrdU в течение 2 ч при 37°C в увлажняемой камере для культур клеток. После аспирации метящих сред, клетки фиксируют и денатурируют посредством добавления 200 мкл этанола в каждую лунку и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Этанол отсасывают, и к клеткам добавляют 100 мкл конъюгированного с пероксидазой антитела анти-BrdU (анти-BrdU-POD; 1:100 в буфере для разбавления антитела). Клетки инкубируют вместе с антителом в течение 90 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывают 3×250 мкл промывочного буфера/лунка и к каждой лунке добавляют 100 мкл тетраметилбензидина. Клетки инкубируют в течение 15-30 мин при комнатной температуре перед спектрофотометрическим анализом.

Устройство для считывания планшетов SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunny Vale CA) используют для измерения коэффициента поглощения каждой лунки на 370 нм. Кривые отклика на концентрацию генерируются посредством вычисления уменьшения оптической плотности у образцов, обрабатываемых исследуемым соединением, по сравнению с контролями, обрабатываемыми ДМСО.

Все соединения 1-18 демонстрируют в этом анализе значения LD₅₀, равные или меньшие, чем 0,1 мкМ, в клетках НСТ116. Соединения 1-3, 5, 7-14, 17 и 18, все, демонстрируют в этом анализе значения LD₅₀, равные или меньшие, чем 1,0 мкМ, в клетках SW480. Соединения 4 и 6 не исследуют.

Пример 7. Анализы *in vivo*.

Модель эффективности на опухоли *in vivo*.

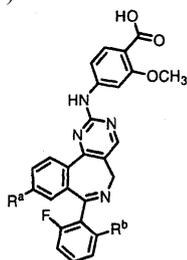
Клетки НСТ-116 (1×10^6) в среде МакКоя 5А асептически вводятся как инъекция в подкожное пространство в правой задней лапе самки голых мышей CD-1 (возраст 8 недель, Charles River) с использованием иглы размера 23. Объемы опухоли вычисляют с использованием стандартных процедур ($0,5 \times (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$). Когда опухоли достигают объема приблизительно 200 мм, мышам перорально дозируют соединение I или соединение III при различных дозах в основе из 10% HPbCD + 1% NaHCO₃. Дозы (0,1 мл) вводят через желудочный зонд размера 22. Контрольные животные получают только одну основу. Животные дозируются раз в день в течение 21 дня, и имеется 10 животных в каждой группе. Размер опухоли и массу тела измеряют дважды в неделю. Соединения I и III хорошо переносятся при всех дозах в этом исследовании. При каждой дозе соединение I дает более продолжительную задержку роста опухоли [TGD = (время для леченых животных, для достижения среднего объема опухоли 1000 мм³) - (время для контрольных животных, для достижения среднего объема опухоли 1000 мм³)] и большее ингибирование роста опухоли [TGI = (средний объем опухоли для контрольных животных / средний объем опухоли для леченых животных) • 100 / (средний объем опухоли для контрольных животных)], чем соединение III.

Хотя указанное выше изобретение описано в некоторых деталях для целей ясности и понимания, эти конкретные варианты осуществления должны рассматриваться как иллюстративные и неограничивающие. Специалисту в данной области из чтения настоящего описания будет ясно, что различные изменения в форме и деталях могут быть проделаны без отклонения от истинных рамок настоящего изобретения, которые должны определяться, скорее, с помощью прилагаемой формулы изобретения, чем с помощью конкретных вариантов осуществления.

Патентная и научная литература, упоминаемая здесь, устанавливает знания, которые доступны для специалистов в данной области. Если не определено иного, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Выданные патенты, заявки и ссылки, которые цитируются здесь, тем самым включаются в качестве ссылок до такой же степени, как если бы каждая из них конкретно и индивидуально указывалась как включенная в качестве ссылки. В случае несоответствий настоящее описание, включая определения будет преимущественным.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, где

R^a выбирают из группы, состоящей из C₁₋₃алифатической группы, -R¹, и -R², где C₁₋₃алифатическая группа представляет собой линейный или разветвленный алкил, алкенил или алкинил, где алкинил необязательно замещен -OCH₃;

R¹ представляет собой C₆₋₁₀арильную группу, необязательно замещенную одним или более заместителем, выбранным из группы, состоящей из гало или C₁₋₃акила; или 5-членную гетероарильную группу, содержащую 1-3 гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, где гетероарильная группа необязательно замещена одним или более заместителем, выбранным из группы, состоящей из гало и C₁₋₃ алкила;

R² выбирают из группы, состоящей из галогена, -C≡C-R³, и -CH=CH-R³;

R³ представляет собой водород или C₁₋₃акил, необязательно замещенный группой -OCH₃; и

R^b выбирают из группы, состоящей из фтора, хлора, -CH₃, -CF₃, -OH, -OCH₃, -OCF₃, -OCH₂CH₃ и -OCH₂CF₃.

2. Соединение по п.1, где R^a представляет собой галоген, -C≡C-R³, или -CH=CH-R³, где R³ представляет собой водород, C₁₋₃ алкил, или -CH₂-OCH₃; или R^a представляет собой фенильное, фурильное, пирролидинильное или тиенильное кольцо, необязательно замещенное одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена и C₁₋₃ алкила.

3. Соединение по п.2, в котором R^a выбирается из группы, состоящей из хлора, фтора, -C≡C-H, -C≡C-CH₃, -C≡C-CH₂OCH₃, -CH=CH₂, -CH=CHCH₃, N-метилпирролидинила, тиенила, метилтиенила, фурила, метилфурила, фенила, фторфенила и толила.

4. Соединение, представляющее собой 4-([9-этил-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5H-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино)-2-метоксибензойную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

5. Соединение, представляющее собой 4-([7-(2-фтор-6-метоксифенил)-9-(1-метил-1H-пиррол-2-ил)-

5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино}-2-метоксибезойную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

6. Соединение, представляющее собой 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино}-2-метоксибезойную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

7. Соединение, представляющее собой натрий 4-{{9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5Н-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино)-2-метоксибензоат.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-7 и фармацевтически-приемлемый носитель.

9. Способ ингибирования активности Аигога-киназы в клетке, включающий контактирование клетки, в которой необходимо ингибирование Аигога-киназы, с соединением по любому из пп.1-7.

10. Способ по п.9, в котором Аигога-киназа представляет собой Аигога А киназу.

11. Способ лечения расстройства, опосредуемого Аигога-киназой, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-7,

12. Способ по п.11, в котором расстройство, опосредуемое Аигога-киназой, представляет собой рак.

13. Способ по п.12, в котором рак выбирают из группы, состоящей из колоректального рака, рака яичников, рака груди, рака желудка, рака простаты и рака поджелудочной железы.

14. Способ по п.13, в котором рак выбирают из группы, состоящей из рака груди, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

